

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
12. Jg. 1974, S. 427–431

Vergleichende Methoden zur quantitativ immunologischen Bestimmung und Ermittlung von Normbereichen der Immunglobuline G, A, M, des Haptoglobins und Transferrins mit Hilfe der automatisierten Immunpräzipitatreaktion¹⁾

Von W. Prellwitz, S. Kapp und D. Müller

Zentrallaboratorium der Medizinischen Kliniken und Institut für Medizinische Statistik und Dokumentation der Universität Mainz

(Eingegangen am 8. Mai/8. Juli 1974)

Die Bestimmung der Immunglobuline G, A, M, des Haptoglobins und Transferrins wurde mit Hilfe der automatisierten Immunpräzipitatreaktion nephelometrisch mit dem Autoanalyser II und dem Nephelofluorometer durchgeführt. Dabei wurden vier verschiedene Methoden miteinander verglichen:

Methode A = Vorverdünnung der Proben und Antiseren mit 0,15 mol/l NaCl

Methode B = Vorverdünnung der Proben mit 0,15 mol/l NaCl

Vorverdünnung der Antiseren mit 0,15 mol/l NaCl + 40 g/l Polyäthylenglycol 6000

Methode C = Vorverdünnung der Proben und Antiseren mit Britton–Robinson-NaCl-Puffer 75,4 mmol/l pH 6,0

Methode D = Vorverdünnung der Proben mit Britton–Robinson-NaCl-Puffer 75,4 mmol/l pH 6,0

Vorverdünnung der Antiseren mit Britton–Robinson-NaCl-Puffer 75,4 mmol/l pH 6,0 + 40 g/l Polyäthylenglycol 6000

Die Korrelationen zwischen den verschiedenen Methoden sind hoch signifikant. Durch Zugabe von Polyäthylenglycol in 0,15 mol/l NaCl konnten in Bezug auf Empfindlichkeit, Peak-Höhen, Inkubationszeiten und Einsparung von Antiseren die günstigsten Ergebnisse erzielt werden. Die Analysen erfolgten unter statistischer Qualitätskontrolle.

Es ergaben sich folgende Normbereiche bei 292 Männern und 261 Frauen (96 Perzentilgrenzen):

IgG: 8–18 g/l (Männer), 7–17 g/l (Frauen),

IgA: 0,75–3,7 g/l (Männer), 0,75–3,25 g/l (Frauen),

IgM: 0,35–2,0 g/l (Männer), 0,46–2,16 g/l (Frauen),

Haptoglobin: 0,5–2,25 g/l (Männer), 0,45–2,07 g/l (Frauen),

Transferrin: 2,45–4,25 g/l (Männer), 2,35–4,20 g/l (Frauen).

Comparative methods for the quantitative immunological determination and normal values of the Immunoglobulins G, A, M, Haptoglobin and Transferrin with the automated Immuno-Precipitin-Reaction

The determination of the Immunoglobulins G, A, M, Haptoglobin and Transferrin was carried out using the automated Immuno-Precipitin-Reaction with an Autoanalyser II equipped with a fluoronephelometer. The following methods were compared:

Method A = Antigen and antibody dilutions made with 0.15 mol/l NaCl

Method B = Antigen dilutions made with 0.15 mol/l NaCl

Antibody dilutions made with 0.15 mol/l NaCl containing 40 g/l Polyäthylenglycol 6000

Method C = Antigen and antibody dilutions made with Britton–Robinson-NaCl-buffer 75.4 mmol/l pH 6.0

Method D = Antigen dilutions made with Britton–Robinson-NaCl-buffer 75.4 mmol/l pH 6.0

antibody dilutions made with Britton–Robinson-NaCl-buffer 75.4 mmol/l pH 6.0 containing 40 g/l Polyäthylenglycol

The correlations between the various methods is statistically significant. The results show, that method B with polyäthylenglycol is superior in respect of sensitivity, limit of detection, peak height, saving of antisera and reduction of incubation time in the system. Statistical quality control was applied to the analyses. The following normal values in 292 men and 261 women were obtained (96-percentil-limit):

IgG: 8–18 g/l (men), 7–17 g/l (women),

IgA: 0.75–3.7 g/l (men), 0.75–3.25 g/l (women),

IgM: 0.35–2.0 g/l (men), 0.46–2.16 g/l (women),

Haptoglobin: 0.5–2.25 g/l (men), 0.45–2.07 g/l (women),

Transferrin: 2.45–4.25 g/l (men), 2.35–4.20 g/l (women).

Die Beurteilung einzelner Serumproteine gewinnt für die Diagnose, Differentialdiagnose und Verlaufskontrolle verschiedener Erkrankungen zunehmend an Bedeutung. Für die quantitative Bestimmung von Serumproteinen stehen heute im allgemeinen folgende Methoden zur Verfügung: radiale Immunodiffusion, Raketenimmuno-elektrophorese und chemische Bestimmungen. Die Nach-

teile dieser Methoden sind zum Teil erwiesen. Die Bestimmungen sind zeitaufwendig, teuer und häufig unspezifisch. Von zahlreichen Untersuchern (1–8) wurde die Bestimmung der bei der Antigen-Antikörperreaktion

¹⁾ Mit freundlicher Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des SFB 36.

entstehenden Immunpräzipitate mit Hilfe der Nephelometrie beschrieben. Durch die Einführung des Autoanalysers II und des Fluoronephelometers konnten die Messungen der Immunpräzipitatreaktion mechanisiert werden. Diese Methode wird heute allgemein als automatisierte Immunpräzipitatreaktion bezeichnet.

In dieser Arbeit wurden mit dem Autoanalyser II zur Bestimmung der Immunglobuline, des Haptoglobins und Transferrins vier verschiedene Methoden miteinander verglichen.

Methodik

Geräte

Autoanalyser II der Firma Technicon Instruments Corporation Tarrytown, N. Y. USA bestehend aus Probenpumpe (Sampler IV), Proportioning Pump III, Manifold, Transformer, Fluoronephelometer II mit Durchflußzelle 013-B0008-01 und Schreiber.

Reagenzien

Referenzseren

A. I. P. Reference Serum (Human) T 03-0495-51 der Firma Technicon

Antiseren

Anti-Human-Sera von der Ziege der Firma Technicon. Standard-Human-Serum stabilisiert ORDT Behring Werke zur Richtigkeits- und Qualitätskontrolle.

Polyäthylenglycol 6000 Art. 807491 Merck-Schuchardt
Britton-Robinson-NaCl-Puffer 75,4 mmol/l pH 6,0

Lösung 1:

2,85 mmol/l Citronensäure nach Sørensen (Merck)
2,85 mmol/l Monokaliumhydrogenphosphat p. a. (Merck)
2,85 mmol/l Barbitol p. a. (Merck)
2,85 mmol/l Borsäure nach Sørensen (Merck)
61,6 mmol/l NaCl

Lösung 2:

20 mmol/l Natriumhydroxid-Plättchen p. a. (Merck)
61,6 mmol/l NaCl

Lösung 1 wird mit Lösung 2 auf pH 6,0 eingestellt.

Vorgehen

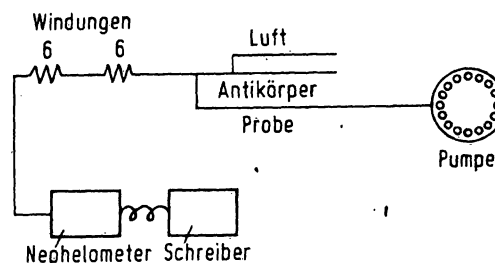
Jede Messung wurde mit einer manuellen Vorverdünnung der Serumproben im Verhältnis 1:100 und 1:300 vorgenommen. Die Proben wurden sämtlich durch ein Milliporefilter GSW 02500 0,22 µm filtriert. Dabei wurden folgende Verdünnungslösungen benutzt:

- Methode A: Vorverdünnung von Proben und Antiseren mit 0,15 mol/l NaCl
Methode B: Vorverdünnung der Proben mit 0,15 mol/l NaCl
Vorverdünnung des Antiserum mit 0,15 mol/l NaCl + 40 g/l Polyäthylenglycol 6000
Methode C: Vorverdünnung von Proben und Antiseren mit Britton-Robinson-NaCl-Puffer 75,4 mmol pH 6,0
Methode D: Vorverdünnung der Proben mit Britton-Robinson-NaCl-Puffer 75,4 mmol/l pH 6,0
Vorverdünnung der Antiseren mit Britton-Robinson-NaCl-Puffer 75,4 mmol/l pH 6,0 + 40 g/l Polyäthylenglycol 6000.

Allen Verdünnungslösungen wurde 1 ml/l Tween 20 zugesetzt.

Das Fließschema und die Durchflußgeschwindigkeiten sind in Abbildung 1 dargestellt. Bei Verwendung von Polyäthylenglycol betrug die Inkubationszeit 4 min, ohne Polyäthylenglycol 17 min. Die Verdünnungen der entsprechenden Antisera für die einzelnen Methoden sind in Tabelle 1 aufgeführt.

mit Polyäthylenglycol



ohne Polyäthylenglycol

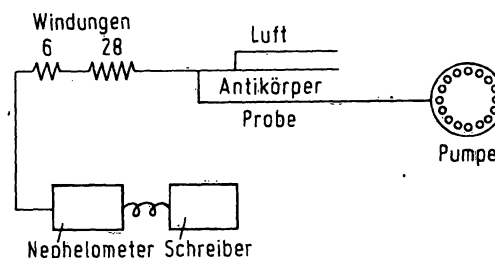


Abb. 1. Fließschema und Durchflußvolumina zur quantitativ immunologischen Bestimmung von Serumproteinen mit Hilfe der automatisierten Immunpräzipitatreaktion mit und ohne Polyäthylenglycol 6000.

Durchflußgeschwindigkeiten in ml/min für die angegebenen Methoden

	IgG	IgA	IgM	Hapto- globin	Trans- ferrin
Probe	0,03	0,01	0,01	0,03	0,03
Antiserum	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32
Luft	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32
Pumpe	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02

Tab. 1. Verdünnungen der Antiseren zur Bestimmung der Immunglobuline, des Haptoglobins und Transferrins bei vier verschiedenen Methoden der automatisierten Immunpräzipitatreaktion.

Methode	A	B	C	D
IgG	1:40	1:100	1:40	1:100
IgA	1:40	1:40	1:40	1:40
IgM	1:25	1:40	1:25	1:40
Haptoglobin	1:40	1:100		
Transferrin	1:40	1:110		

Für die Ermittlung der Normbereiche wurden bei insgesamt 292 Männern und 261 Frauen die fünf verschiedenen Serumproteine bestimmt. Diese Probanden wurden poliklinisch untersucht, außerdem bestimmten wir parallel noch weitere klinisch-chemische, hämatologische und gerinnungsphysiologische Parameter, um jede Erkrankung ausschließen zu können.

Ergebnisse

Die Peak-Höhen in mm in Abhängigkeit von der Antigenkonzentration und den verschiedenen Methoden sind in Abbildung 2 ersichtlich. Sowohl bei einer Serumverdünnung von 1:100 und 1:300 sind bis zu einer bestimmten Antigenkonzentration die Peak-Höhen bei Methode B (0,15 mol/l NaCl + 40 g/l Polyäthylenglycol) am

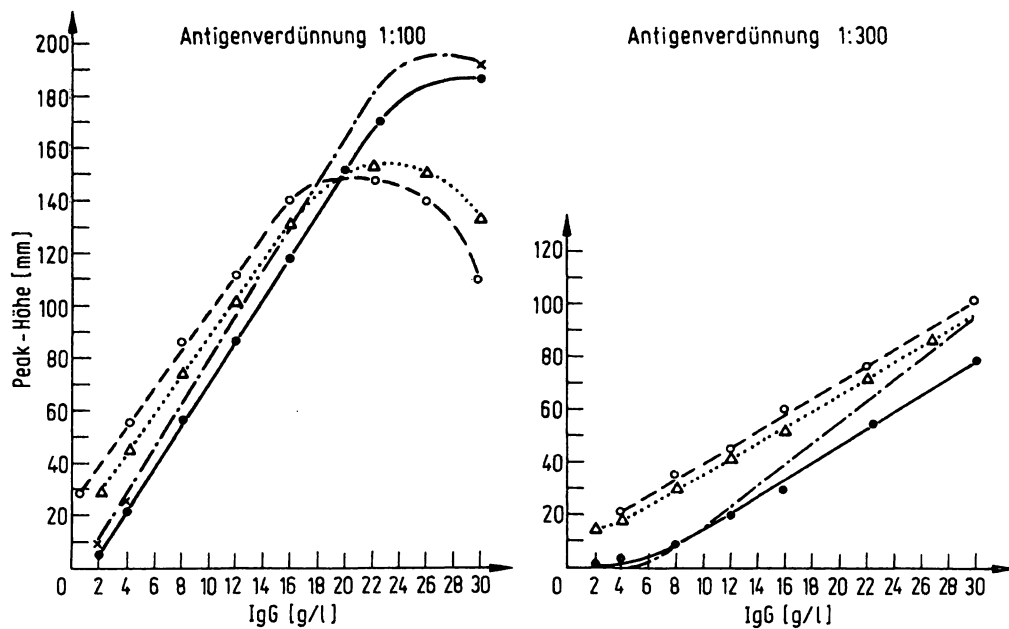


Abb. 2. Peakhöhen in mm bei vier verschiedenen Methoden der IgG-Bestimmung mit Hilfe der automatisierten Immunpräzipitatreaktion.

- 0,15 mol/l NaCl (A)
- 0,15 mol/l NaCl + 40 g/l Polyäthylenglycol (B)
- 75,4 mmol/l Britton-Robinson-NaCl-Puffer pH 6,0 (C)
- △····△ 75,4 mmol/l Britton-Robinson-NaCl-Puffer pH 6,0 + 40 g/l Polyäthylenglycol (D)

höchsten. Damit ist die Empfindlichkeit dieser Methode am größten. Ähnliche Verhältnisse liegen auch bei der Bestimmung der Immunglobuline A, M, des Haptoglobins und Transferrins vor.

In Tabelle 2 sind die oberen und unteren Nachweisgrenzen der Immunglobuline mit der Methode B aufgeführt. Bei der routinemäßigen Bestimmung der Immunglobuline mit einer manuellen Vorverdünnung der Proben von 1:100 und 1:300 können alle in der Klinik wichtigen quantitativen Serumproteinveränderungen erfaßt werden.

Die Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse der Korrelationsrechnungen der Serumproteinbestimmungen mit Hilfe verschiedener Methoden der automatisierten Immunpräzipitatreaktion. Dabei ergeben sich zwischen den Methoden keine Unterschiede. Ähnliche Ergebnisse wurden von anderen Untersuchern publiziert (3, 4, 8, 9).

Die Präzision in der Serie wurde mit dem Standard Human-Serum der Behringwerke überprüft. Bei der Verwendung von Polyäthylenglycol in 0,15 mol/l NaCl (Methode B) für die Bestimmungen der fünf Serumproteine lagen die Variationskoeffizienten zwischen 2,5–4,1 (Tab. 4).

Die Präzision von Tag zu Tag wurde bisher fünf Monate lang durchgeführt. Die Variationskoeffizienten liegen hier selbstverständlich höher als bei der Präzision in der Serie. In Tabelle 5 sind die entsprechenden Werte für die fünf Serumproteine aufgezeichnet.

Die Normbereiche der untersuchten Proteine bei 292 gesunden Männern und 261 Frauen sind in Tabelle 6 dargelegt. Die Verteilung der Werte ist log

Tab. 2. Untere (I) und obere (II) Nachweisgrenzen der Immunglobuline im Serum in g/l.
Methode B (0,15 mol/l NaCl + 40 g/l Polyäthylenglycol)

	IgG		IgM		IgA	
Probenverdünnung	1:100	1:300	1:100	1:300	1:100	1:300
I	1,0	4,0	0,2	0,4	0,2	0,5
II	16	44	2,4	7,0	3,5	9,0

Tab. 3. Korrelationskoeffizienten r zwischen verschiedenen Serumproteinbestimmungen (Methode A, B, C, D) mit Hilfe der automatisierten Immunpräzipitatreaktion.

Protein	Methoden	n	r	Signifikanz
IgG	A/B	150	0,895	++
	A/C	144	0,950	++
	A/D	144	0,871	++
IgM	A/B	110	0,855	++
	A/C	80	0,912	++
	A/D	80	0,865	++
IgA	A/B	140	0,932	++
	A/C	140	0,867	++
	A/D	140	0,913	++

normal. Zwischen Männern und Frauen bestehen keine signifikanten Unterschiede. Werden die Ergebnisse in den verschiedenen Altersgruppen bei Frauen und Männern miteinander verglichen, so zeigt sich bei den Immunglobulinen IgG und IgM ein Trend: mit zunehmendem Alter steigen die arithmetischen Mittelwerte in diesen Gruppen an.

Tab. 4. Präzision in der Serie bei der immunologischen Bestimmung von Serumproteinen (Standard-Human-Serum, Behring Werke Marburg).
Methode B (0,15 mol/l NaCl + 40 g/l Polyäthylenglycol 6000) der automatisierten Immunpräzipitatreaktion.

	IgG				IgA				IgM				Haptoglobin				Transferrin			
Sollwert [g/l] $\bar{X} \pm S$	11,0 \pm 0,82				2,4 \pm 0,18				1,8 \pm 0,06				1,88 \pm 0,08				3,4 \pm 0,14			
	N	\bar{X} [g/l]	S [g/l]	VK [%]	N	\bar{X} [g/l]	S [g/l]	VK [%]	N	\bar{X} [g/l]	S [g/l]	VK [%]	N	\bar{X} [g/l]	S [g/l]	VK [%]	N	\bar{X} [g/l]	S [g/l]	VK [%]
Serum- verdünnungen 1:100	100	11,1	0,275	2,5	80	2,24	0,067	2,8	60	1,81	0,051	2,83	75	1,83	0,06	3,3	90	3,42	0,085	2,5
1:300	150	10,54	0,417	3,95	80	2,44	0,10	4,1	60	1,79	0,062	3,50								

Tab. 5. Präzision von Tag zu Tag innerhalb von 5 Monaten (1–5) bei der immunologischen Bestimmung von Serumproteinen (Standard-Human-Serum, Behring Werke Marburg).
Methode B (0,15 mol/l NaCl + 40 g/l Polyäthylenglycol 6000) der automatisierten Immunpräzipitatreaktion.

	IgG				IgA				IgM				Haptoglobin				Transferrin			
Sollwert [g/l] $\bar{X} \pm S$	12,8 \pm 0,51				2,3 \pm 0,09				0,94 \pm 0,04				1,88 \pm 0,08				3,4 \pm 0,14			
	N	\bar{X} [g/l]	S [g/l]	VK [%]	N	\bar{X} [g/l]	S [g/l]	VK [%]	N	\bar{X} [g/l]	S [g/l]	VK [%]	N	\bar{X} [g/l]	S [g/l]	VK [%]	N	\bar{X} [g/l]	S [g/l]	VK [%]
1	36	12,5	0,56	4,5	36	2,29	0,11	5,0	36	0,96	0,06	6,03	28	1,92	0,08	4,6	28	3,39	0,14	4,3
2	28	12,6	0,45	3,6	28	2,33	0,11	4,8	28	0,90	0,07	6,59	20	1,90	0,12	6,5	26	3,43	0,14	4,2
3	38	12,7	0,62	4,9	38	2,31	0,11	4,7	36	0,98	0,05	5,53	30	1,85	0,12	6,5	33	3,31	0,16	4,8
4	26	12,5	0,59	4,8	36	2,31	0,15	6,6	28	0,95	0,06	7,06	25	1,79	0,11	6,1	30	3,46	0,15	4,3
5	32	12,5	0,38	3,1	32	2,33	0,11	4,8	30	0,98	0,06	6,43	28	1,90	0,09	5,1	32	3,49	0,14	4,2

Tab. 6. Normbereiche der Serumkonzentrationen der Immunglobuline IgG, IgA, IgM, des Haptoglobins und Transferrins bei gesunden Männern und Frauen.

	IgG		IgA		IgM		Haptoglobin		Haptoglobin	
	Männer	Frauen	Männer	Frauen	Männer	Frauen	Männer	Frauen	Männer	Frauen
N	292	261	292	261	292	261	292	261	292	261
\bar{X} [g/l]	12,51	11,52	2,12	1,82	1,09	1,21	1,32	1,21	3,30	3,27
S [g/l]	2,9	2,8	0,81	0,76	0,49	0,50	0,50	0,49	0,49	0,49
96 Perzentil- grenzen [g/l]	8,0–18,0	7,0–17,0	0,75–3,7	0,75–3,25	0,35–2,0	0,46–2,16	0,5–2,25	0,45–2,07	2,45–4,25	2,35–4,20

Diskussion

Für die quantitative nephelometrische Bestimmung immunologischer Antigen-Antikörper Reaktionen müssen optimale Reaktionsbedingungen gefunden werden, um hohe Streulichtintensitäten zu erhalten. Nach Untersuchungen von *Ebeling* (9) sind für die Nephelometrie

besonders die Ionenstärke und der pH-Wert der Verdünnungslösungen sowie die Inkubationszeiten wichtig. Bei der Bestimmung des Transferrin konnten diese Bedingungen nur mit einem 75,4 mmol/l Puffer pH 6,0 erreicht werden. *Ritchie* (10) dagegen beschrieb als günstigste Verdünnungslösung für Proben und Antisera 0,15 mol/l NaCl. In den hier aufgeführten

Untersuchungen konnten zwischen der 0,15 mol/l NaCl und dem 75,4 mmol/l Puffer pH 6,0 in Bezug auf Korrelationskoeffizienten, Richtigkeit und Präzision in der Serie und von Tag zu Tag keine Unterschiede gefunden werden. Die Peakhöhen differieren nur geringfügig zwischen beiden Methoden.

Von erheblicher Bedeutung für die Immunpräzipitationsreaktion ist dagegen die Verwendung von Polyäthylenglycol. Nach bisher vorliegenden Untersuchungen (11–14) vermutet man einen Einfluß auf die Präzipitation löslicher Antigen-Antikörper-Komplexe und eventuell eine Konstanterhaltung der Präzipitateilchen. Ob dabei Änderungen der sterischen Konfiguration der Antigen-Antikörper-Komplexe eine Rolle spielen, wird vermutet.

Wir haben, anlehnend an die Methoden A und B, in 0,15 mol/l NaCl mit und ohne Verwendung von Polyäthylenglycol bei konstanten Antikörperkonzentrationen eine *Heidelberger-Kurve* (15) gemessen. Dabei konnte eine Verschiebung des Äquivalenzpunktes zur geringeren Antigenkonzentration durch Polyäthylenglycol beobachtet werden (Abb. 3). Dieser Befund spräche für eine

Präzipitation löslicher Antigen-Antikörper-Komplexe und könnte den geringeren Verbrauch an Antisera und die kürzere Inkubationszeiten erklären.

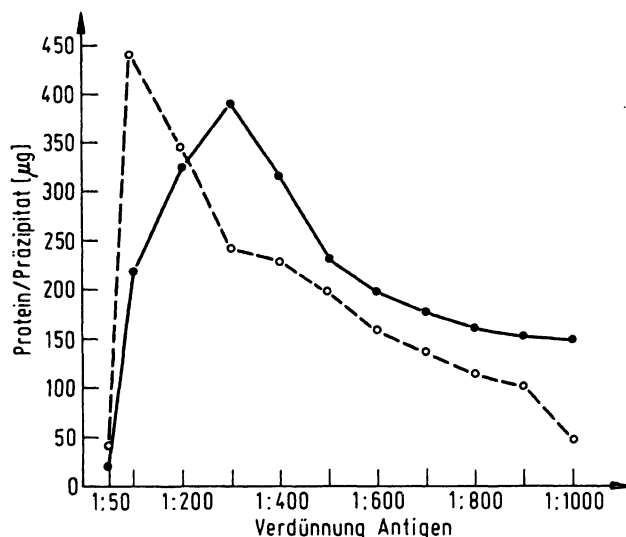


Abb. 3. *Heidelberger-Kurve*: IgG-Globuline µg Protein im Präzipitat bei konstanter Antikörperkonzentration mit (●—●) und ohne (○—○) Polyäthylenglycol.

Literatur

1. Ginthin, D. & Edelloch, H. (1951), *J. Immunol.* 66, 57–77.
2. Larson, C., Orenstein, P. & Ritchie, R. F. (1970), *Thurman Assoc. Miami, Florida* 9–17.
3. Larson, C., Orenstein, P. & Ritchie, R. F. (1971), *Adv. Aut. Anal.* 1, 101–107.
4. Larson, C., Gorman, J. & Becker, A. (1972), *Techn. Intern. Cong. N. Y.* 21–23.
5. Riccomi, H., Masson, P. & Heremans, J. F. (1972), *Techn. Intern. Cong.* 53, N. Y. 5–9.
6. Ritchie, R. F. (1967), *J. Lab. Clin. Med.* 70, 512–519.
7. Marcroft, J. & Newland, L. M. (1973), *Clin. Chim. Acta* 46, 399–405.
8. Killingsworth, L. M. & Savory, J. (1971), *Clin. Chem.* 17, 936–940.
9. Ebeling, H. (1973), *diese Z.* 11, 209–214.
10. Ritchie, R. F., Alper, C. A., Graves, J., Pearson, N. & Larson, C. (1973), *Amer. J. Clin. Path.* 59, 151–157.
11. Hellsing, K. (1969), *Biochem. J.* 112, 475–481.
12. Hellsing, K. (1969), *Biochem. J.* 112, 483–487.
13. Hellsing, K. (1972), *Techn. Intern. Cong.*, 17–20 (N. Y.).
14. Creighton, W. D., Lambert, P. H. & Mischer, P. A. (1973), *J. Immunol.* 111, 1219–1227.
15. Heidelberger, M. & Kendall, F. E. (1935), *J. Exp. Med.* 62, 167–169.

Prof. Dr. W. Prellwitz
6500 Mainz
Langenbeckstraße 1